

ÜBER DIE FREIEN UND GEBUNDENEN AMINOSÄUREN DES
ZENTRALNERVENSYSTEMS UND IHR VERHÄLTNIS
ZUEINANDER BEI NORMALEN UND MIT CHLORPROMAZIN
BEHANDELTEN TIEREN

Gunther Mayer

München

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548301_0084

Aus der II. Med. Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

ÜBER DIE FREIEN UND GEBUNDENEN AMINOSÄUREN DES ZENTRAL-
NERVENSYSTEMS UND IHR VERHÄLTNIS ZUEINANDER BEI NORMALEN
UND MIT CHLORPROMAZIN BEHANDELTEN TIERE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
G u n t h e r M a y e r
Nüdlingen
1964

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. G. Knauff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

Dekan: Prof. Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. V. 64



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material	4
Methodik	4
a) Quantitative Bestimmung der Proteinamino- säuren des Zentralnervensystems	4
b) Quantitative Bestimmung der serin- und äthanolaminhaltigen Gehirnlipide	8
c) Quantitative Bestimmung der serin- und äthanolaminhaltigen Gehirnlipide nach hohen Megaphendosen	11
d) Quantitative Bestimmung von Glutaminsäure, gamma-ABS, Äthanolamin und der Gesamt- menge der freien Aminosäuren des Gehirns	11
Ergebnisse	12
Diskussion	21
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	27

Ungefähr 40 % des Hirntrockengewichts bzw. 10 % des Frischgewichtes bestehen aus Proteinen. Trotzdem ist über diese Stoffe weniger bekannt als über andere Gehirnbestandteile (FOLCH und LEES 1951; FOLCH, LEES und SLOANE-STANLEY 1957; FOLCH, LEES und CARR 1958). Methodische Gründe dürften mit dafür verantwortlich sein. Das höchst komplizierte Lipoproteinsystem des Gehirns mit verschiedenen, leicht denaturierbaren Protein- und Lipidkomponenten erschwert nämlich die Gewinnung sauberer Fraktionen außerordentlich. Die Aminosäurezusammensetzung der Hirnproteine ist daher noch weitgehend unbekannt. Insbesondere wurde bisher fast nie die Zusammensetzung der Gesamtproteine des Zentralnervensystems zu bestimmen versucht. Seit früheren Arbeiten von HALIBURTON (1894) isolierte man meist nur einzelne Proteinfractionen zu weiterer Analyse. Genaue Werte für den Aminosäurebestand des Gesamthirns lassen sich daraus nicht errechnen, da die von verschiedenen Autoren mit unterschiedlicher Methodik erhaltenen Fraktionen nicht übereinstimmen.

Die in ziemlich weitem Bereich schwankenden Angaben älterer Autoren über die Gesamtproteine des Zentralnervensystems (PETROWSKY 1873; HALIBURTON 1894; ABDERHALDEN und Mit. 1913; PALLADIN und ZUWERKALOF 1924 u. a.) haben heute nur noch historisches Interesse, obwohl ihre Werte selbst in neueren Übersichten (ELLIOT, PAGE und QUASTEL 1955) oft als einzige Angabe zitiert werden. In neuerer Zeit hat BLOCK (1937; 1951) die Gehirnproteine untersucht. Er gibt jedoch nur die Relativwerte einiger Proteinamino-säuren des Gesamthirns bezogen auf den Proteinstickstoff an. DEMLING, KINZLMAYER und HENNING (1954); ROSSITER (1955); HOFMAN und SCHINKO (1956); PALLADIN (1957), ROBERTSON (1957) und CUMINGS (1959) trennten durch Papier- oder Stärkegelelektrophorese verschiedene Proteinfractionen. Sie erfaßten damit jedoch nicht den gesamten Proteinbestand des Zentralnervensystems und haben die Aminosäurezusammensetzung nicht näher untersucht. DINGMAN, SPORN und DAVIES (1959) haben durch Ammonsulfatfällung und fraktionierte Extraktion mit NaCl-Lösung die Gesamtproteine erfaßt und in sieben verschiedenen Komponenten getrennt bestimmt. Sie geben quantitative Werte für Gesamtprotein-, Lipid- und Nukleinsäuregehalt an, bestimmten aber lediglich den Anteil an Arginin und Prolin. Die Gesamtproteinkonzentration beträgt nach dieser sorgfältigen Arbeit 70 ± 10 mg pro Gramm frisches Hirngewebe.

Die Aminosäurezusammensetzung der Proteolipide (FOLCH und LEES, 1951; FOLCH, LEES und SLOANE-STANLEY, 1957; FOLCH, LEES und CARR, 1958), die einen wichtigen Bestandteil der Myelinscheiden darstellen, wurde bisher ebenfalls nicht weiter untersucht. Nur UZMAN und Mitarb. (UZMAN und ROSEN, 1958; UZMAN und RUMLEY, 1960), die kürzlich über lipophile

Peptide und Proteine des Zentralnervensystems berichteten, haben bei einer ihrer Fraktionen die Aminosäurezusammensetzung bestimmt.

Die Umsatzrate der Hirnproteine ist ziemlich hoch (LAJTHA, 1959; GEIGER, 1960; BARKULIS, GEIGER, KAWAKITA und AGUILA, 1960). Ihre Aminosäuren stehen in dauerndem lebhaften Austausch mit den freien Aminosäuren (DINGMAN, SPORN und DAVIES, 1959; GEIGER, 1960; BARKULIS, GEIGER, KAWAKITA und AGUILA, 1960; GAITONDE und RICHTER, 1957; LAJTHA und FÜRST, 1955; CLOUET und RICHTER, 1957; LAJTHA, FÜRST, GERSTEIN und WAELSCH, 1957). LAJTHA und Mitarb. (LAJTHA, FÜRST, GERSTEIN und WAELSCH, 1957; COHN, GAITONDE und RICHTER, 1954) ermittelten mit radioaktiv markiertem Leucin und Lysin für die Hirnproteine eine Halbwertszeit von 2 - 3 Tagen. Versuche mit radioaktiv markiertem S₃₅-Methionin ergaben ein ähnliches Resultat (GAITONDE und RICHTER, 1957; COHN, GAITONDE und RICHTER, 1954).

Das Spektrum der freien Hirnaminosäuren unterscheidet sich erheblich von dem der Proteinaminosäuren. ROBERTS, FRÄNKEL und HARMAN (1950) haben dies bereits bemerkt. Ihre ziemlich grobe, semiquantitative Methodik ermöglichte jedoch keine genaueren Aussagen. In früheren Arbeiten haben KNAUFF und Mitarb. (1958; 1959; 1960; 1961) über die freien Aminosäuren des Gehirns berichtet und für viele Substanzen quantitative Werte angegeben. Aus der Gegenüberstellung dieser Werte mit denen der Protein-Aminosäuren erwarteten wir weitere Einblicke in Funktion und Stoffwechselrate der freien Aminosäuren. Für Stoffe, die in hoher Konzentration in den Proteinen, aber nur in verschwindend geringer Menge frei vorkommen, ist eine Eigenfunktion als freie niedermolekulare Substanz weniger wahrscheinlich. Sie dürften hauptsächlich als Baustein höhermolekularer Stoffe gebraucht werden. Umgekehrt spricht eine hohe Konzentration einer freien Aminosäure bei relativ geringem Vorkommen in gebundener Form für wesentliche Eigenfunktionen dieser Aminosäure, selbst wenn man unterschiedliche Umsatzraten der verschiedenen Einzelsubstanzen voraussetzt.

Ein vollständiger Überblick über alle im Zentralnervensystem vorhandenen Aminosäuren läßt sich jedoch nur gewinnen, wenn auch die Phosphatide mit berücksichtigt werden. Im Gehirn sind in den Serin und Äthanolamin enthaltenden Lipiden erhebliche Mengen von Aminoverbindungen vorhanden, die mit dem freien Serin und Äthanolamin und über diese mit anderen Aminosäuren im Austausch stehen. Mit vergleichbarer Methodik gewonnene Literaturangaben über die Konzentration dieser Phosphatidbausteine im Gesamthirn fehlen jedoch weitgehend (MC ILWAIN, 1959). Wir haben daher nach Reingewinnung und hydrolytischer Spaltung der Hirnkephaline ihr Serin und Äthanolamin mit dem gleichen Ver-

fahren quantitativ bestimmt, die auch zur Untersuchung der anderen Hirnamino-säuren verwendet worden waren.

In vorhergehenden Untersuchungen hatten wir die Konzentration der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide und der Proteine des Zentralnervensystems bei normalen Ratten und auch bei Tieren bestimmt, die einer fünfstündigen Insulinhypoglykämie ausgesetzt wurden. Dabei ergaben sich vor allem Veränderungen der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide und einiger freier Aminosäuren. Wir fragten uns, ob diese Veränderungen Ursache oder Folge des tiefen Komas oder der Krampftätigkeit seien oder ob sie allein durch den Substratmangel bedingt seien und bei vergleichbaren Bewußtseinsstörungen ohne Hypoglykämie fehlen. Auf diese Probleme und die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen wiesen schon KNAUFF und BÖCK (1959) bei der Untersuchung der freien Aminosäuren bei Insulinhypoglykämie hin. Sie schlugen Versuche mit Elektroschock, Krampfgiften und zentral wirksamen narkotisierenden Substanzen vor. Wir wählten für unsere Untersuchungen das Megaphen ^x, einen Stoff, der einen komaähnlichen Zustand durch zentrale Wirkung ohne primären Substratmangel erzielt. Wie bei den Ratten im Insulinkoma wurden einige freie Aminosäuren und die serin- und äthanolaminhaltigen Lipide untersucht. Für besonders wichtig hielten wir bei den freien Aminosäuren die quantitative Bestimmung der gamma-ABS^{xx}, von der man vermutet, daß ihr Mangel Ursache für die zentral bedingten Krämpfe sein könnte. (ELLIOTT und JASPER 1958; MAKINO und Mit. 1954; TOWER 1956; KILLAM und BAIN 1957; KILLAM 1957; RINDI und FERRARI 1959).

x = 2-Chlor-10-(3'-dimethylaminopropyl)-phenothiazin-hydrochlorid = Chlorpromazin

xx = gamma-Aminobuttersäure

Material.

Whistar - Albinoratten

Untersuchungen der	Anzahl	Gewicht	behandelt mit
Proteinamino-säuren des ZNS	20	200-240	-, -
Serin- äthanolaminhalti- gen Gehirnlipide	16	200-240	-, -
"	12	300	0,1g Megaphen/kg
"	9	300	-, -
Freie Aminosäuren des ZNS	5	300	-, -
Freie Aminosäuren des ZNS	11	300	0,1g Megaphen/kg

Tab. 1: In der Tabelle sind die einzelnen Versuchsserien mit der Anzahl der Tiere und der Art der Untersuchung angegeben.

Für unsere Versuche verwendeten wir gesunde Whistar-Albinoratten aus einem einheitlichen Laborstamm. Für die beiden ersten Untersuchungen wurden Tiere mit einem Gewicht von 200 - 240 g verwendet. Die späteren Versuche wurden mit etwa 300 g schweren Ratten ausgeführt. Gefüttert wurden sie nur mit einem vollwertigen Standardfutter (Altromin / Altrogge). Die in Tab. 1 aufgeführten Versuchsserien wurden jeweils gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Zur Standardisierung unserer Methodik wurde die mehrfache Anzahl an Versuchstieren verwendet.

Methodik.

a) Quantitative Bestimmung der Proteinamino-säuren des Zentralnervensystems.

Die Futteraufnahme und das Verhalten der Tiere wurde einige Tage beob-

achtet. Dann wurden die Ratten ohne Narkose durch Genickschlag getötet. Um Blutungen ins Hirngewebe oder innerhalb der Schädelkapsel zu vermeiden, wurde gleichzeitig die Blutzufuhr zum Gehirn durch eine Gummischlinge abgedrosselt. Die Kopfhaut wurde sofort mit einer Rasierklinge aufgeschlitzt und der Schädel mit einem scharfgeschliffenen, kräftigen Skalpell halbiert. Groß- und Kleinhirn konnten dann leicht und schnell mit zwei anatomischen Pinzetten herausgehoben werden.

Blutspuren wurden mit dem Fließpapier abgetupft. Die Hirnsubstanz wurde auf ein gekühltes Uhrglas gelegt. Das Uhrglas befand sich in einem kleinen, von flüssiger Luft umgebenen Metallgefäß und hatte eine Temperatur von weniger als -150°C . In 10 bis 15 Sekunden waren die Gehirne durchgefroren. Die Zeit vom Töten der Tiere bis zum völligen Einfrieren des Gewebes dauerte nur 30 - 40 Sekunden.

Bei früheren Versuchen wurden die ganzen Köpfe in flüssige Luft getaucht (KNAUFF und BÖCK 1960; 1961). Wegen der schlechten Wärmeleitfähigkeit des Gewebes, insbesondere der Schädelkapsel, vergeht dabei mindestens eine Minute, bis die Gehirne restlos durchgefroren und alle Stoffwechselvorgänge unterbrochen sind. Da die Entnahme des Gehirns jedoch am tiefgefrorenen Kopf wesentlich schwieriger ist, als im Frischzustand, gaben wir dem hier geschilderten Verfahren den Vorzug.

Die gut durchgefrorenen Gehirne wurden auf dem Uhrglas gewogen und dann in ein vorgekühltes Homogenisierungsröhrchen überführt, das sich in einem Eisbad befand und 6 ml salzsaures Azeton enthielt (1 Teil 0,1 n HCl auf 4 Teile Azeton). Das gekühlte Uhrglas verblieb dabei auf dem Wägeteller. Sein Gewicht mußte sofort nach der Abnahme des Gehirns abgelesen werden. Ein vorheriges Wiegen des Uhrglases ergab einen kleinen Fehler durch Reifbildung. Das Hirngewebe wurde 5 Minuten im Homogenisator nach POTTER bei mittlerer Tourenzahl homogenisiert und das Homogenat dann mit 13 000 Umdrehungen pro Minute in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 4 ml gekühltem salzsauren Azeton nachgewaschen und erneut abzentrifugiert. Er enthielt die Eiweiße und einen Teil der Lipide, darunter die Hauptmenge der Phosphatide, die ebenfalls Aminosäuren enthalten und daher entfernt werden müssen. Die Fraktion der freien Aminosäuren war dagegen quantitativ im Überstand enthalten, ferner die größere Menge der Neutralfette. Der mit Azeton gewaschene Niederschlag wurde im Zentrifugenröhrchen zwei Tage lang im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann in einem kleinen Porzellanmörser zu einem feinen Pulver verrieben. Das Pulver wurde nochmals gewogen, in eine besonders dichte Soxhlethülse überführt

und im Soxhlet-Apparat 4 Stunden mit wasserfreiem Äther extrahiert. Die Lipoproteine bleiben dabei, wie Versuche ergeben haben, quantitativ zurück. Etwa 90 % der im Niederschlag vorhandenen aminosäurehaltigen Phosphatide konnten dagegen entfernt werden. Eine hundertprozentige Extraktion der Phosphatide ist nicht möglich, da sie viele Stunden betragen würde. Dabei würden dann auch kleinere Mengen anderer ninhydrin-färbbarer Substanzen (wahrscheinlich Lipoproteine) in Lösung gehen.

Der Extraktionsrückstand wurde sorgfältig aus der Soxhlet-Hülse entfernt. Die Hülse mußte dabei mehrfach mit einem größeren Volumen 6 n HCl nachgespült werden. Um sicher zu gehen, daß keine Eiweißreste in der Hülse zurückbleiben, haben wir in einigen Fällen die Hülsen zerkleinert und mit Salzsäure hydrolysiert. In dem Hydrolysat der Hülse wurden nur geringe Aminosäurespuren gefunden. Nennenswerte Verluste scheinen also nicht einzutreten.

Der Eiweißniederschlag wurde dann zusammen mit der zum Auswaschen der Hülse benutzten Salzsäure in ein Hydrolysierkölbchen überführt und mit 6 n HCl zu einem Endvolumen von 30 ml aufgefüllt. Die Kölbchen wurden in einer Stickstoffatmosphäre unter vermindertem Druck zugeschmolzen und 12 Stunden bei 115° C hydrolysiert.

Das Hydrolysat wurde durch eine Glasfritte filtriert, diese mit 0,1 n HCl nachgespült und die Salzsäure im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit destilliertem Wasser aufgenommen, zur Trockne eingengt und nochmals mit destilliertem Wasser aufgenommen. 1/5 der Gesamtmenge wurde in einer modifizierten Apparatur nach ASTRUP (ASTRUP, 1951), die eine bessere Kühlung erlaubte (KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF, 1959), 20 Min. lang elektrolitisch entsalzt. Dabei treten, wie umfangreiche Vorversuche ergaben, noch keine wesentlichen Verluste ein. Die entsalzte Lösung wurde erneut völlig eingengt und dann mit einem ml 0,1 n HCl pro 0,08 g ursprünglicher Hirntrockensubstanz aufgenommen. Diese Lösung konnte unmittelbar zur papierchromatographischen Aminosäurebestimmung verwendet werden.

Von jedem Hydrolysat wurde zunächst ein zweidimensionales Elektropherogramm angefertigt. Wir benutzten dazu das früher angegebene kombinierte Verfahren, bei dem das Aminosäuregemisch in erster Dimension durch Hochspannungselektrophorese und dann in zweiter Dimension auf dem gleichen Bogen durch aufsteigende Papierchromatographie aufgetrennt wird (KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF, 1959; KNAUFF, SELMAIR und REITLINGER, 1960). Zur Hochspannungselektrophorese verwendeten wir einen Ameisensäure-

Eisessig-Puffer vom pH 1,9. Die Spannung betrug 4 - 6 000 V (70 - 100 V/cm). Zur anschließenden Chromatographie benutzten wir das Gemisch Butanol, Eisessig, Wasser (4 : 1 : 5). Die mit Ninhydrin nach LEVY und CHUNG (LEVY und CHUNG, 1953) gefärbten Chromatogramme gestatteten eine sofortige Identifizierung der einzelnen Aminosäuren.

Die quantitative Bestimmung wurde nach einem früher angegebenen (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF, 1950; KNAUFF und WINDSHEIMER, 1960), eindimensionalen, papierchromatographischen Verfahren durchgeführt, das in Anlehnung an das Vorgehen von FISCHER und DÖRFEL (FISCHER und DÖRFEL, 1953), sowie von GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKEL (GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKEL, 1955) entwickelt wurde. Die große Zahl verschiedener Aminosäuren in den Hydrolysaten erforderte jeweils 3 Chromatogramme in 3 verschiedenen Laufmitteln nebeneinander. Wir verwendeten stets die Gemische n-Butanol / Eisessig / Wasser 4:5:1, Methyläthylketon / Pyridin / Wasser 7:1, 5:1, 5 und Isopropanol / Eisessig / Wasser 7:1, 5:1, 5.

Die Chromatogramme wurden durch Einschnitte in Längsrichtung in mehrere getrennte Streifen unterteilt. Auf einen Streifen wurden jeweils 0,005 ml, entsprechend den Proteinamino-säuren von 0,4 mg Hirntrockensubstanz, auf einen zweiten Streifen 0,015 ml, entsprechend 1,2 mg Trockensubstanz, aufgetragen.

Zur Kontrolle und zur Bestimmung einiger papierchromatographisch nicht trennbarer oder schlecht anfärbbarer Aminosäuren wurden bei einigen Ratten auch elutionschromatographische Bestimmungen an Ionenaustauschersäulen mit automatischer Registrierung der Ergebnisse nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (1958; MOORE, SPACKMAN und STEIN, 1958) mit der von HANNIG (1959) entwickelten Apparatur (Hersteller: Bender und Hobein, München) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1,6 mg des Proteinhydrolysates, gelöst in 2 ml Pufferlösung, entsprechend 4 mg des Hirntrockengewichts zur Bestimmung der neutralen und sauren Aminosäuren auf eine mit Dowex 50 x 8 gefüllte Austauschersäule und die gleiche Menge zur Bestimmung der basischen Aminosäuren auf eine mit Amberlite IRC - 50 gefüllte Säule aufgetragen. KNAUFF, SELMAIR und ZICKGRAF (1960), KNAUFF und SCHABERT (1960) haben über methodische Einzelheiten dieses Verfahrens berichtet.

b) Quantitative Bestimmung der serin- und äthanolaminhaltigen Gehirnlipide.

Die Tötung der Tiere und die Entnahme des Gewebes geschah wie bei den Versuchen zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Gehirnproteine. Die sofort nach dem Tode entnommenen Gehirne wurden in einer in flüssiger Luft befindlichen Schale gefroren und danach gewogen. Dann wurden sie mit 6 ml kaltem, salzsaurem Azeton (1 Teil 0,1 n HCl auf 4 Teile Azeton) in einem vorgekühlten, in einem Eisbad befindlichen Homogenisierungsröhrchen 5 Minuten bei mittlerer Tourenzahl homogenisiert und das Homogenat mit 13 000 Umdrehungen/min in einer Kälzentrifuge zentrifugiert.

Im Überstand sind etwa 5% der Kepheline zusammen mit Neutralfetten und freien Aminosäuren enthalten. Die Hauptmenge der Kepheline befindet sich mit anderen Lipiden, Proteinen und anorganischen Salzen im Niederschlag. Die weitere Aufarbeitung ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Der Überstand wurde vorsichtig zur Trockne eingeeengt, der Rückstand wieder mit 20 ml Äther und 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Äther und Wasser wurden in einem Scheidetrichter getrennt und die Ätherphase mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Die wässrige Lösung wurde erneut mit frischem Äther ausgeschüttelt und auch die zweite Ätherportion nochmals mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Die freien Aminosäuren sind danach ausschließlich in der wässrigen Phase enthalten. Diese Fraktion wurde für die vorliegende Untersuchung nicht benötigt. Die Ätherphase enthält neben den Neutralfetten den kleinen Teil der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide (etwa 5 %), der beim vorherigen Zentrifugieren in den Azetonüberstand gegangen war. Peptide und Proteine sind in der Ätherphase nicht mehr vorhanden. Zum Ausschluß haben wir in mehreren Versuchen den Ätherextrakt eingeeengt und mit 6 n HCl bei 115° C 12 Stunden hydrolysiert. Wir konnten im Hydrolysat zwar stets Serin und Äthanolamin, jedoch nur Spuren anderer Aminosäuren nachweisen.

Der abzentrifugierte Niederschlag enthält neben anderen Lipiden und den Proteinen 95 % der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide. Er wurde, wie oben beschrieben, zu einem Trockenpulver aufgearbeitet und im Soxhletapparat 4 Stunden mit wasserfreiem Äther extrahiert. Dadurch konnten etwa 90 % der im Niederschlag vorhandenen serin- und äthanolaminhaltigen Phosphatide gewonnen werden. Eine 100 % Extraktion ist nicht möglich, da sie viele Stunden betragen würde und dabei auch andere ninhydrinfärbbare Substanzen (wahrscheinlich Lipoproteine) in Lösung gehen.

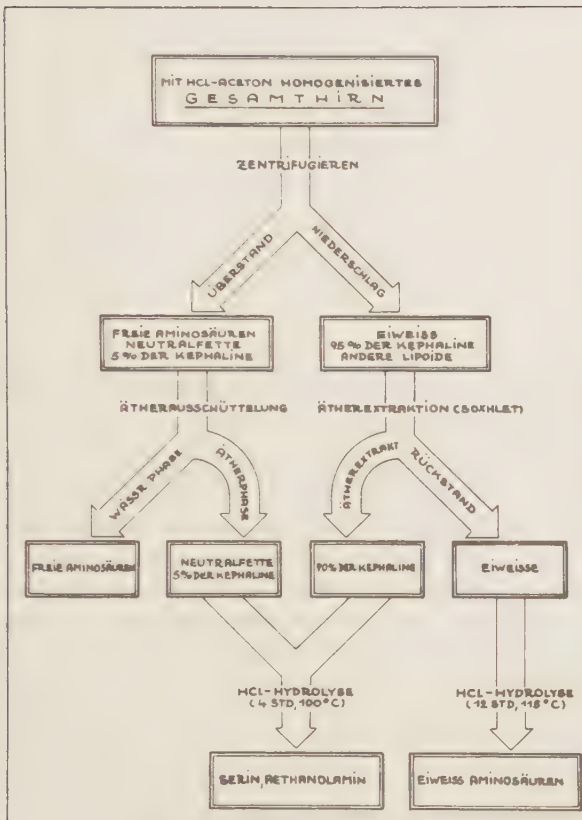


Abb. 1 Schematische Darstellung unseres Arbeitsganges zur Gewinnung der Proteine, der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide und der freien Aminosäuren aus Gehirngewebe.

In Vorversuchen haben wir die für uns wichtigen Lipide mit Chloroform-Methanol zu extrahieren versucht. Wir gaben dieses Verfahren aber wieder auf, da damit die Lipoproteine ebenfalls mit herausgelöst werden und

ihre spätere vollständige Abtrennung durch Ausschütteln einer Ätherlösung mit Wasser nicht einfach ist. Wir konnten sie nur dann ziemlich vollständig entfernen, wenn wir die Chloroform-Methanollösung einengten, den Rückstand zur Denaturierung kurz auf 100° C erwärmten, dann mit Äther aufnehmen und mit Wasser ausschüttelten. Dabei ging jedoch auch ein Teil der serin- und äthanolaminhaltigen Substanzen verloren, so daß das Verfahren für uns nicht brauchbar war. Die sonst häufig zur Phosphatidgewinnung vorgeschlagene Extraktion mit Äther-Alkohol war nicht erforderlich, da sie neben den Kephalingen auch die Lezithine erfaßte, auf deren quantitative Bestimmung wir von vornherein verzichtet haben. Die Extraktion mit reinem Äther reichte daher völlig aus.

Der Ätherextrakt wurde mit der Ätherphase vereinigt, die wir bei der Ätherausschüttelung des Azetonextraktes bekommen hatten und die die restlichen 5 % der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide enthielt. (Vgl. Abb. 1). Die vereinigten Ätherextrakte, die nun etwa 95 % der gesamten im Gehirn vorhandenen serin- und äthanolaminhaltigen Lipide (Kephalinge u.a.) enthielten, wurden in ein Hydrolisierkölbchen überführt und der Äther durch leichtes Erwärmen entfernt. Zu dem Trockenrückstand kamen 20 ml 6 n HCl. Dann wurde das Kölbchen unter Unterdruck in einer Stickstoffatmosphäre zugeschmolzen und 4 Stunden bei 100° C hydrolisiert. Anschließend wurde die Salzsäure im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit 20 ml Äther und 10 ml Wasser aufgenommen. Äther- und Wasserphase wurden in einem Schütteltrichter getrennt und die Ätherphase nochmals mit frischem Wasser ausgewaschen. Die wässrige Lösung wurde sodann erneut zur Trockne eingeeengt und mit 0.5 ml 0.1 n HCl pro 0.35 g ursprünglicher Hirntrockensubstanz aufgenommen. Diese Lösung konnte direkt zur Papierchromatographie verwendet werden.

Die quantitative Bestimmung wurde mit Hilfe eines bewährten papierchromatographischen Verfahrens durchgeführt (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF 1959). Dazu wurden 0.01 ml der oben angegebenen Endlösung, entsprechend den phosphatidgebundenen Aminosäuren von 7 mg Hirntrockensubstanz (das Frischgewicht beträgt im Durchschnitt das 4,65-fache des Trockengewichtes), strichförmig auf 4 cm breite Papierstreifen aufgetragen und die Streifen 16 Stunden aufsteigend in Isopropanol-Eisessig-Wasser 7 : 1.5 : 1.5 chromatographiert, dann mit Ninhydrin nach BODE (1955) gefärbt, transparent gemacht und mit einem direkt schreibenden Extinktionsmeßgerät (Elphor-Intergraph der Firma Bender und Hobein) vermessen. Die erhaltenen Werte werden auf eine gleichzeitig auf einen anderen Streifen desselben Bogens chromatographierte, ähnlich zusammengesetzte Testaminosäuremischung bezogen. Da in dieser Fraktion außer Äthanolamin und Serin nur geringe Spuren anderer Aminosäuren

vorhanden waren, erubrigte sich die sonst gepflegte Parallelchromatographie in mehreren Laufmitteln. Die Spurenaminosäuren dürften aus nicht vollständig abgetrennten Lipoproteinen stammen. Unsere papierchromatographisch ermittelten Werte haben wir in einigen Fällen durch elutionschromatographische Bestimmungen an der Ionenaustauschersäule nach SPACKMANN, STEIN und MOORE (1958) mit kontinuierlicher Aufzeichnung der Ergebnisse überprüft. Wir verwendeten dazu die von HANNIG (1959) entwickelte Apparatur (Hersteller: Bender und Hobein, München) und benutzten eine 50 cm lange, mit dem sauren Ionenaustauscher Amberlite IRC-50 gefüllte Chromatographiesäule. Für methodische Einzelheiten verweisen wir auf die Arbeiten von KNAUFF, SELMAIR und ZICKGRAF (1959). KNAUFF und SCHABERT (1960).

c) Quantitative Bestimmung der serin- und äthanolaminhaltigen Gehirnlipide nach hohen Megaphendosen.

12 der 21 Ratten dieser Versuchsserie spritzten wir mit 0,1g Megaphen/kg Körpergewicht. Durch subkutane Injektion versuchten wir eine über viele Stunden dauernde Megaphenwirkung zu erreichen. Die Tiere vertrugen bei subkutaner Applikation eine wesentlich höhere Dosis Megaphen als bei intramuskulärer Verabreichung. Etwa eine halbe Stunde nach Applikation dieser Menge verfielen sie in einen tiefen, komaähnlichen Schlaf. Nur bei stärkeren Schmerzreizen ließen sich stark verlangsamte Abwehrbewegungen auslösen. Um eine Unterkühlung der Ratten zu vermeiden, waren die Tiere in einem temperaturkonstanten Behälter, der eine Umgebungstemperatur von ca. 30° C hatte, untergebracht. Nach 8 Stunden wurden die Tiere getötet. Die Rattengehirne wurden gegenüber den früheren Serien (vgl. a und b der Methodik) nicht im Glas-homogenisator nach Potter, sondern im Ultra-Turrax (Fa. Braun / Melsungen) zerkleinert. Sonst ergaben sich keine Veränderungen gegenüber der oben beschriebenen Methodik.

Gleichzeitig wurde eine Serie von 9 unbehandelten Tieren unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Obwohl wir bereits früher (siehe oben) Normalwerte für 16 Ratten bestimmt hatten, war das nötig, da Schwankungen vor allem des Kephalingehaltes auftraten, die möglicherweise durch jahreszeitliche Unterschiede oder durch das höhere Lebensalter der Ratten dieser Versuchsserie bedingt sein konnten.

d) Quantitative Bestimmung von Glutaminsäure, gamma-ABS, Äthanolamin und der Gesamtmenge der freien Aminosäuren des Gehirns.

Zu den 11 mit Megaphen behandelten Tieren wurde gleichzeitig zur Kontrolle eine Serie von 5 unbehandelten Ratten aufgearbeitet. Die Megapheninjektion,

das Töten und die Aufarbeitung des Gehirns geschah wie oben beschrieben. Zum Zerkleinern des Gehirns verwendeten wir auch bei der Gewinnung der freien Aminosäuren den Ultra-Turrax (Fa. Braun / Melsungen). Gegenüber früheren Versuchsserien wurde das Gehirn nicht mit einer vorgemischten Salzsäure-Azetonlösung zerkleinert, sondern in einer reinen wasserfreien Azetonlösung (4 mal 5 sec. mit dem Ultra-Turrax). Diese ließen wir gut gekühlt 2- 3 min. einwirken und gaben dann 1/4 des vorher zugegebenen Volumens Azeton n/10 HCl dazu und homogenisierten das Gemisch nochmals im Ultra-Turrax (4 mal 5 sec.). Wir versprachen uns durch das Einwirken des reinen, unverdünnten Azetons einen stärkeren Wasserentzug und damit besseren Aufschluß des Gewebes.

Die Trennung von den Lipiden und Proteinen, die elektrolytische Entsalzung und die qualitative Auftrennung durch Elektropherogramm sowie die quantitative Bestimmung der Aminosäuren mittels Chromatographie geschah wie schon oben beschrieben. Siehe auch KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF (1959), KNAUFF und ZICKGRAF (1958), KNAUFF und BOCK (1960; 1961).

Ergebnisse.

In den Hydrolysaten der Gesamtproteine des Rattengehirns wurden folgende Stoffe regelmäßig qualitativ nachgewiesen: Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Ornithin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin.

Einen Überblick über das Aminosäurespektrum eines solchen Hydrolysates gibt das in Abb. 2 wiedergegebene kombinierte zweidimensionale Hochspannungselektropherogramm. Zu Chromatogrammen der freien Gehirnamino-säuren (KNAUFF und BÖCK 1960; 1961) besteht ein deutlicher Unterschied. Die Flecken von Glutaminsäure, Glutamin, gamma-Aminobuttersäure, Serin und Taurin, die dort das Bild beherrschen, sind wesentlich schwächer ausgeprägt oder sie fehlen ganz. Glutamin wird bei der Hydrolyse zerstört, gamma-Aminobuttersäure und Taurin kommen in den Proteinen nicht vor. Die Flecken von Arginin, Methionin, Lysin, Ornithin, Prolin und Tyrosin sind dagegen bei den Hydrolysaten wesentlich deutlicher ausgeprägt. Auch die Flecken von Alanin, Glycin, Leucin, Isoleucin und Valin sind viel intensiver und beherrschen das Chromatogramm.

Ein quantitativ ausgewerteter, eindimensionaler Chromatographiestreifen ist in Abb. 3 wiedergegeben. Darüber befindet sich die zugehörige Extinktionskurve, die sich aus acht gut getrennten und gut auswertbaren Gaußkurven zusammensetzt.

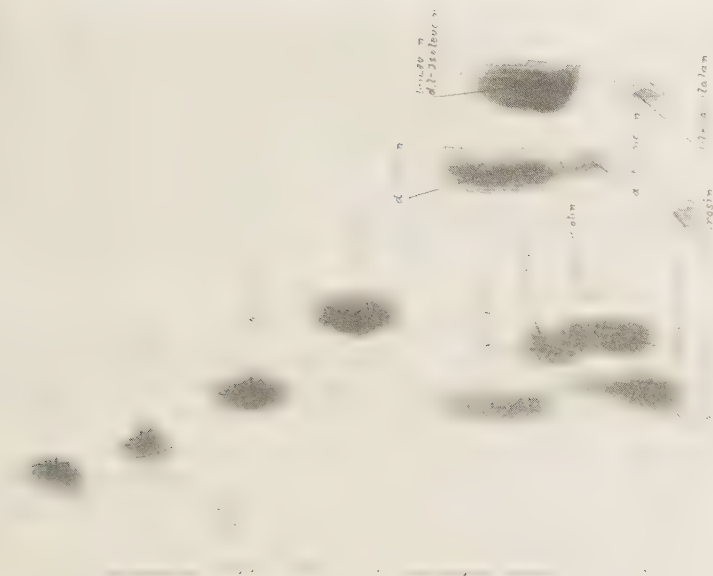


Abb. 2 : Zweidimensionales Elektropherochromatogramm des Hydrolysates der Proteinfraction eines normalen Rattengehirns. Auftragsstelle im Schnittpunkt der Geraden. Hochspannungselektrophoretische Trennung mit 6000 V (100 V / cm), 25 m Amp, 180 min., pH 1,9. Danach aufsteigende Papierchromatographie senkrecht zur elektrophoretischen Trennrichtung, 2 mal 20 Stunden in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5). Färbung nach LEVY und CHUNG. Auftragsmenge 0,004 ml, entsprechend den eiweißgebundenen Aminosäuren aus ca. 0,3 mg Hirngewebe.

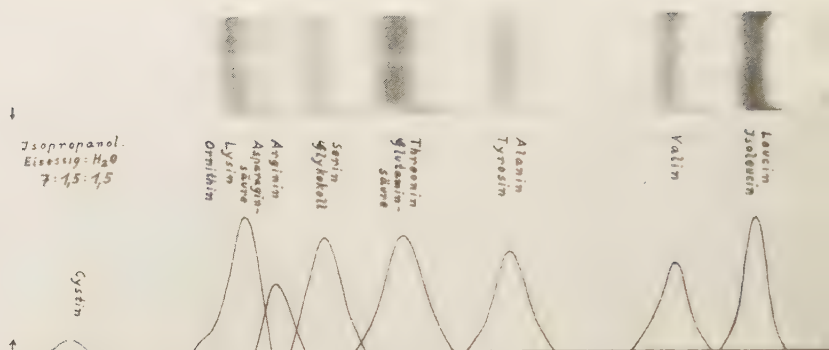


Abb. 3 : Eindimensionaler Chromatographiestreifen des Hydrolysates der Gehirnproteine einer normalen Ratte nach Chromatographie in Isopropanol/Eisessig/Wasser (7:1, 5:1,5). Färbung mit Ninhydrin (später zur Haltbarmachung mit einer Kupfersalzlösung besprüht). Darunter die zugehörige Extinktionskurve. Auftragsmenge 0,005 ml, entsprechend den Proteinen aus 0,4 mg Hirntrockensubstanz. Man erkennt 8 Gaußkurven, die in Verbindung mit ähnlichen, in anderen Laufmitteln entwickelten Chromatogrammen eine exakte quantitative Auswertung erlauben. Der Pfeil markiert die Startlinie.

Das Chromatogramm wurde in Methyl-Äthylketon / Pyridin / Wasser (7:1, 5:1,5) entwickelt. Bei Verwendung der anderen Lösungsmittel entstanden jeweils andere Banden. Dadurch konnten insgesamt 12 verschiedene Einzelaminosäuren papierchromatographisch bestimmt werden.

Die Aminosäuren eines Teiles der Hydrolysate wurden außer durch Papierchromatographie auch durch Elutionschromatographie an Ionenaustauschersäulen qualitativ bestimmt. Diese genauere Methode wurde hauptsächlich zur Kontrolle der papierchromatographisch ermittelten Werte eingesetzt. Ein entsprechendes Chromatogramm ist in Abb. 4 wiedergegeben. Man erkennt hier 18 Gipfel, die den Aminosäuren aus 1,6 mg Gehirnproteinen entsprechen. Neben den bereits papierchromatographisch bestimmten Substanzen konnten Methionin, Phenylalanin und Prolin zusätzlich bestimmt werden. Die bei der Papierchromatographie häufig schlecht getrennten Aminosäurepaare Arginin-Asparaginsäure, Lysin-Ornithin und Serin-Glykokoll konnten ebenfalls einwandfrei getrennt und genau bestimmt werden. Dies war ein wesentlicher Vorteil, da wir trotz Chromatographie in jeweils drei verschiedenen Laufmitteln bei einigen Ratten lediglich einen gemeinsamen Wert für beide Substanzen hätten angeben können.

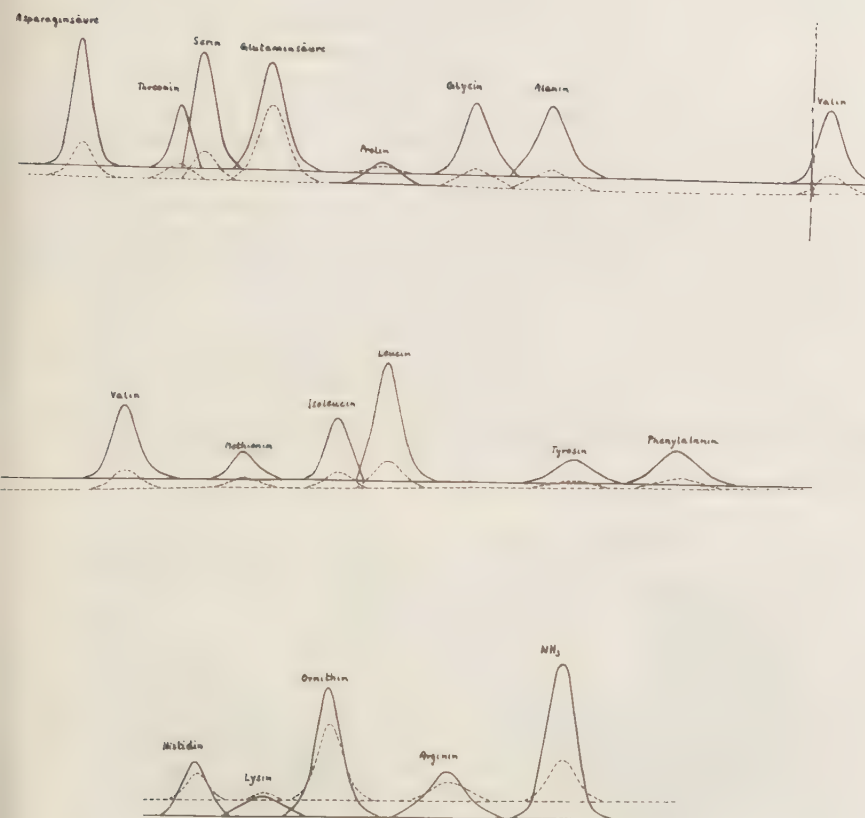


Abb. 4 : Elutionschromatogramm eines Hydrolysates der Proteinfraction eines normalen Rattengehirns. Analysenmenge 1,6 mg entsprechend den Proteinen aus 4 mg Rattengehirn (Trockengewicht). Die Bezeichnungen für Lysin und Ornithin wurden auf der Abbildung versehentlich vertauscht.

Die quantitative Berechnung der bei sämtlichen Ratten erhaltenen Chromatogramme ergab die in Tab 1 zusammengefaßten Werte. Die elutionschromatographisch ermittelten Werte stimmen in jedem Fall so eng mit den papierchromatographisch ermittelten Werten überein, daß eine weitere Diskussion entfällt.

matographisch ermittelten Werten überein, daß wir auf ihre gesonderte Wiedergabe verzichten. Wir haben in Tab. 1 ferner zum Vergleich die Werte von KNAUFF und BÖCK (1960; 1961) für freie Gehirnaminosäuren mit aufgeführt

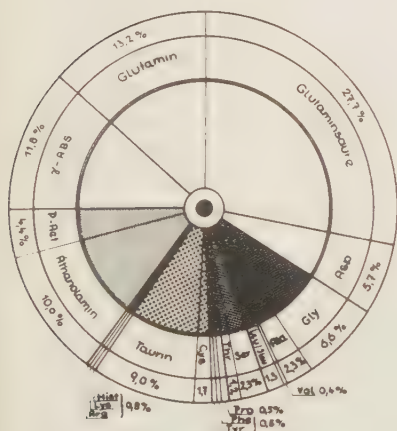
Setzt man die Konzentration der Proteinamino-säuren zu der der freien Aminosäuren in Beziehung, dann erhält man die in der letzten Spalte von Tab. 1 zusammengefaßten Relationszahlen. Da Glutamin bei der Hydrolyse in Glutaminsäure umgewandelt wird, haben wir auch bei den freien Aminosäuren beide Substanzen als Glutaminsäure ausgedrückt. Die Relationszahlen zeigen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Aminosäuren. Taurin und gamma-Aminobuttersäure, die als freie Substanzen im Gehirn in erheblicher Menge vorkommen, sind keine Eiweißbausteine.

Wenn man aus den freien und aus den Proteinamino-säuren jeweils den Gesamtamino-säurestickstoff berechnet und die Einzelsubstanzen als Prozent des Gesamtamino-säurestickstoffes ausdrückt, lassen sich die Unterschiede im Aminosäurespektrum zwischen freien und gebundenen Aminosäuren des Zentralnervensystems leicht überblicken.

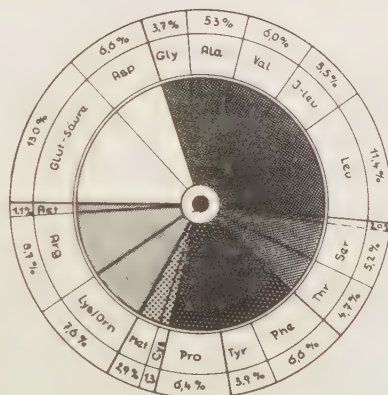
Tab. 1:		Proteinamino-säuren		freie	gebundene/
		(mg/g)		Aminos.	freie Aminosäuren
Substanz	M	$\pm \sigma$	Schwank. br.	(μ g/g)	
Ala	5,87	0,57	4,45 - 6,56	60,8	96,6
Arg	9,63	1,89	7,88 - 11,52	14,0 ⁺	687,9
Asp	7,34	0,16	7,10 - 7,59	226,1	32,5
Cystin	1,51	0,33	0,93 - 2,36	12,0	125,8
Glu	14,91	1,23	13,63 - 16,45	1756,8	8,5
Gly	4,15 ^x	-	-	146,5	28,4
Gly/Ser	9,23	1,86	6,65 - 11,90	-	-
His	5,47	-	-	9,0 ⁺	607,8
Ileu	6,14	1,08	4,91 - 8,33	51,7	363,1
Leu	12,63	1,38	10,48 - 16,77	13,5	622,0
Lys/Orn	8,40	0,94	7,05 - 10,97	15,0 ⁺	200,0
Met	3,00 ^x	-	-	12,0 ⁺	591,7
Phe	7,10 ^x	-	-	16,0 ⁺	412,5
Pro	6,60 ^x	-	-	69,7	72,7
Ser	5,07 ^x	-	-	42,3	122,9
Thr	5,20	1,34	3,10 - 7,34	11,0	392,7
Tyr	4,32	1,21	2,58 - 6,23	14,9	443,6
Val	6,61	1,34	5,65 - 8,47		

Tab. 1 : Konzentration der Proteinamino-säuren in mg/g Hirngewebe (Frischgewicht) bei einer Serie von 20 normalen Ratten. Die mit Sternchen ^x bezeichneten Werte konnten nur elutionschromatographisch ermittelt werden. Da diese zusätzliche Bestimmung nur bei wenigen Ratten durchgeführt wurde, verzichteten wir auf die Angabe von Standardabweichungen oder Schwankungsbreiten. Glycin und Serin wurde zwar bei allen Ratten papierchromatographisch bestimmt, die Trennung der Glycin- und Serinbande war jedoch oft ungenügend, sodaß wir einen gemeinsamen Wert für beide Substanzen angegeben haben. Die Einzelwerte für Glycin und Serin wurden elutionschromatographisch bestimmt. Zum Vergleich wurden in Spalte 4 auch die Werte von KNAUFF und BÖCK (1960, 1961) für freie Gehirnaminosäuren mit aufgeführt. Der Quotient aus der Konzentration der Proteinamino-säuren durch die Konzentration der freien Aminosäuren ergibt die in Spalte 5 aufgeführten Relationszahlen. Die mit Kreuz⁺ bezeichneten Werte wurden der Literatur entnommen (TALLAN, MOORE und STEIN 1954).

FREIE AMINOSÄUREN DES GEHIRNS



PROTEIN U. PHOSPHATIDGEBUNDENE AMINOSÄUREN DES GEHIRNS



In Abbildung 5 ist das Aminosäurespektrum als Kreisscheibe dargestellt, in der die Einzelaminosäuren durch einzelne Sektoren repräsentiert werden. Um einen Vergleich der freien Aminosäuren mit allen "gebundenen" Aminosäuren des Gehirns zu ermöglichen, wurden in der Zeichnung nicht nur die Proteinaminosäuren berücksichtigt, sondern auch das in den Phosphatiden enthaltene Äthanolamin und Serin. Die quantitativen Werte für diese Stoffe betragen 0,61 mg Serin und 1,07 mg Äthanolamin pro g frische Hirnsubstanz. Über ihre Bestimmung siehe oben. Sie machen gegenüber den Proteinaminosäuren nur wenige Prozent aus.

Unsere Untersuchungen der serin- und äthanolaminhaltigen Lipide des Zentralnervensystems ergab eine Phosphatidfraktion, deren Hydrolysat an ninhydrinfärbaren Substanzen praktisch nur Äthanolamin und Serin enthielt. In einigen Fällen haben wir von den Extrakten auch kombinierte zweidimensionale Elektropherogramme angefertigt. Dieses Verfahren ist eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis verschiedenster in geringer Konzentration vorhandener Stoffe (KNAUFF und ZICKGRAF 1958; KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF 1958, 1959; KNAUFF und SCHABERT 1961; KNAUFF, SELMAIR und REITLINGER 1960). Wir haben damit zwar noch Spuren anderer Aminosäuren als ganz zarte Flecken nachgewiesen, die jedoch in keinem Verhältnis zur Intensität und Größe der Serin- und Äthanolaminflecken standen. Wahrscheinlich stammen sie aus den schwer entfernbaren und daher nicht ganz vollständig abgetrennten Lipoproteinen. Mit Sicherheit handelt es sich nicht um Verunreinigungen durch freie Aminosäuren, wie sie von anderer Seite in Phosphatidfraktionen anderer Herkunft, wie Bakterienkulturen, Papain usw. gefunden wurden (VILKAS und LEDERER 1955; ZOCH 1958).

Möglicherweise handelt es sich bei diesen Aminosäurespuren auch um echte Phosphatidaminosäuren. In den Phosphatiden von Pilzen, Kaninchenleber und Hühnerovidukt wurden nämlich neuerdings außer Serin geringe Mengen anderer verschiedener Aminosäuren in chemischer Bindung nachgewiesen (HENDLER 1959, GABY 1959, 1960). Selbst in vitro nehmen gewisse Phosphatidfraktionen dieser Herkunft noch Aminosäuren auf und binden sie. Vielleicht ist auch im Gehirn mit geringen Mengen derartiger Phosphatide zu rechnen.

Abb. 6 zeigt einen eindimensionalen, quantitativ ausgewerteten Chromatographiestreifen und die zugehörige Extinktionskurve. Es sind lediglich zwei dem Äthanolamin und dem Serin entsprechende Banden erkennbar. Die aus den Lipoproteinen stammenden Aminosäurespuren bleiben unter der Empfindlichkeits-

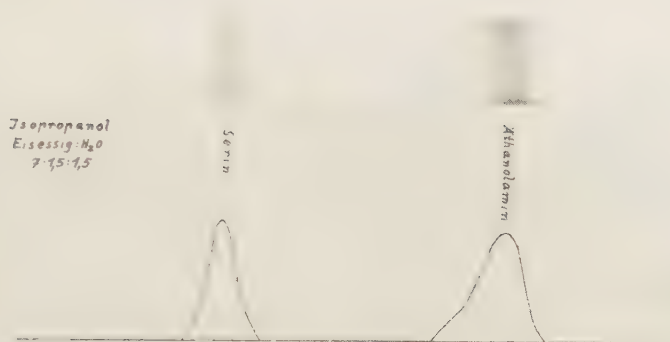


Abb. 6 : Eindimensionales Papierchromatogramm des Hydrolysates der serin- und äthanolaminhaltigen Phosphatidfraktionen eines normalen Rattengehirns. Auftragsmenge 0,01 ml, entsprechend der Phosphatidmenge aus 7 mg Hirntrockensubstanz.

grenze des Extinktionsschreibers.

Die aus sämtlichen Chromatogrammen unserer Versuchsreihe ermittelten Werte sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die elutionschromatographisch bestimmten Werte waren praktisch mit den papierchromatographischen Werten identisch, da bei Gegenwart von nur zwei Substanzen die Papierchromatographie fast ebenso exakte Ergebnisse liefert wie die Elutionschromatographie. Wir verzichten daher darauf, auch diese Werte in Tabellenform wiederzugeben, zumal nicht bei allen Tieren derartige Bestimmungen durchgeführt wurden.

Substanz	Mittelwert $\pm \sigma$	Schwankungsbreite
Serin	0,607 $\pm$ 0,037	0,462 - 0,815
Äthanolamin	1,07 $\pm$ 0,040	0,839 - 1,31

Tab. 2 : Konzentration von Phosphatidyl-Äthanolamin und Phosphatidyl-Serin in mg/g frischem Hirngewebe bei einer Serie von 16 normalen Ratten.

Tab. 3 :

Äthanolamin:

	Mittelwert $\pm \sigma$	Schwankungsbreite	t
Normaltiere	1055 $\pm$ 93,8	955 - 1270	1,31
Megaphentiere	1123 $\pm$ 124,6	955 - 1410	

Serin:

Normaltiere	704 $\pm$ 95,5	568 - 855	1,37
Megaphentiere	787 $\pm$ 137,0	557 - 1052	

Tab. 3 : Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin in μ g/g frischem Gehirngewebe von 9 Normalratten und 12 mit 0,1 Megaphen/kg Körpergewicht behandelten Tieren.

Wie aus der Tab. 3 zu ersehen ist, kommt es bei dem phosphatidgebundenen Serin und Colamin zu einer geringen Vermehrung, die aber statistisch nicht zu sichern ist.

Tab. 4 :

Ratten	Mittelwerte $\pm \delta$	Schwankungsbreite	t
<u>Werte der gesamten freien Aminosäuren:</u>			
Normal	3360 $\pm$ 277	3020 - 3660	0,5
Megaphen	3565 $\pm$ 348	2950 - 3940	
<u>Äthanolamin:</u>			
Normal	199,5 $\pm$ 20,2	174 - 223	0,5
Megaphen	204,0 $\pm$ 15,1	178 - 233	
<u>Glutaminsäure:</u>			
Normal	1145 $\pm$ 91,5	1010 - 1260	0,57
Megaphen	1248 $\pm$ 86,0	1080 - 1400	

	Mittelwerte $\pm$ s	Schwankungsbreite	t
<u>Gamma-Aminobuttersäure:</u>			
Normal	330 $\pm$ 32,1	282 - 365	
Megaphen	368 $\pm$ 19,8	327 - 405	2,94

Tab. 4: Freie Aminosäuren des Gehirns in $\mu\text{g/g}$ frischem Hirngewebe von 5 Normalratten und 11 mit Megaphen behandelten Tieren.

Der Unterschied der Normalwerte bei diesen Tieren gegenüber der früheren Serie dürfte dadurch bedingt sein, daß ältere Tiere eines anderen Tierstammes benutzt worden waren und daß wir die Methode etwas modifiziert haben.

Die Untersuchung der freien Aminosäuren unter Megapheneinwirkung ergab die in Tab. 4 angeführten Ergebnisse. Bei der Gesamtmenge der freien Aminosäuren und beim Äthanolamin liegt der Mittelwert der Megaphenratten etwas über dem Mittelwert der Normalratten. Der Unterschied ist wegen der Schwankung der Werte und wegen der relativ geringen Zahl der Versuchstiere nicht signifikant. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Glutaminsäure, die zwar eine durchschnittliche Erhöhung um 8,9 % aufweist, aber auch eine große Streuung der Werte hat. Der Mittelwert der gamma-ABS liegt bei den Megaphentieren 11,5 % über dem der Normalratten. Die Abweichung ist für die gamma-ABS signifikant ($t = 2,94$).

Diskussion.

Für die meisten Protein-Aminosäuren des Gesamthirns können wir zum ersten Mal genaue Absolutwerte vorlegen. Die Summen sämtlicher von uns bestimmten Aminosäuren beträgt 113,22 mg/g frisches Hirngewebe. Wenn man diesem Wert das Gewicht der H_2O -Moleküle abzieht, die bei der hydrolytischen Spaltung der Peptidbindungen der Proteine aufgenommen werden, dann ergibt sich mit 98,0 mg Protein pro Gramm Hirngewebe ein gut mit den Angaben von DINGMANN, SPORN und DAVIS (1959) übereinstimmender Wert. Auch der von ihnen angegebene prozentuale Anteil an Prolin und Arginin, den beiden Aminosäuren, die diese Autoren näher untersucht haben, stimmt mit unseren Werten überein.

Auch im Gehirn liegen die proteingebundenen Aminosäuren in ganz erheblich größerer Menge vor als die freien Aminosäuren. Mit Ausnahme der gamma-Aminobuttersäure gilt dies auch für diejenigen Stoffe, die dort besondere Funktionen erfüllen, wie freie Glutaminsäure. Insgesamt unterscheidet sich das Aminosäurespektrum der Proteinaminosäuren erheblich von dem der freien Aminosäuren des Gehirns (KNAUFF und BÖCK 1960; 1961) und des Liquors (KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF 1959; KNAUFF und SCHABERT 1961). Es wird

nicht wie dort durch wenige in großer Menge vorhandene Substanzen beherrscht, denen nur geringe Mengen aller anderen Aminosäuren gegenüberstehen, sondern man findet ähnlich wie beim Aminosäurespektrum anderer Körperproteine oder der freien Plasmaamino­säuren (KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF 1959; KNAUFF und WINDSHEIMER 1960), ein ausgeglicheneres Verhältnis zwischen den einzelnen Aminosäuregruppen. Glutaminsäure und Asparaginsäure machen zusammen etwa 17 % des Gesamtamino­säurestickstoffes aus. Die Basen einschließlich des in den Phosphatiden enthaltenen Äthanolamins bestreiten etwa den gleichen Prozentsatz. Die restlichen 70 % verteilen sich auf die neutralen Aminosäuren, von denen, wie bei den freien Plasmaamino­säuren oder den Aminosäuren anderer Proteine, die aliphatischen Monoaminomonokarbonsäuren die Hauptmenge ausmachen.

Die Relationszahlen, die das Verhältnis der Proteinamino­säuren zu den freien Aminosäuren angeben, sind für die einzelnen Substanzen wieder sehr unterschiedlich und schwanken von 8-700. Gamma-Aminobuttersäure und Taurin sind sogar ausschließlich in freier Form vorhanden. Auf jedes Molekül freier Glutaminsäure kommen dagegen trotz seiner hohen, alle anderen freien Aminosäuren übertreffenden Konzentration 8 Moleküle eiweißgebundener Glutaminsäure. Auch Asparaginsäure, Glycin und Serin kommen im Verhältnis zur gebundenen Form noch in beachtlicher Menge als freie Substanzen vor. Bei Serin ist die Verhältniszahl jedoch schon auf 1 : 73, bei Mitberücksichtigung des Phosphatidylserins auf 1 : 80 abgesunken. Bei Alanin, Cystin und Threonin beträgt der Konzentrationsunterschied etwa 1 : 100. Bei anderen Aminosäuren tritt die freie Form gänzlich hinter der gebundenen Form zurück. Das Extrem bilden hier die Basen, bei denen auf 600 - 700 eiweißgebundene Moleküle nur ein Molekül der freien Substanz kommt.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die aliphatischen Monoaminomonokarbonsäuren im Gehirn wohl im wesentlichen als Bausteine hö­hermolekularer Stoffe betrachtet werden müssen. Eine Eigenfunktion als freie Aminosäure ist nicht nur nicht bekannt, sondern danach nicht wahrscheinlich. Die wichtigen Aufgaben, die gerade die Glutaminsäure als Schlüsselsubstanz des Aminosäurestoffwechsels im Gehirn (WEIL - MALHERBE 1936; 1952; 1953; WAELSCH 1951; STRECKER 1954; LAJTHA und WAELSCH 1959; LAJTHA, BERL und WAELSCH 1959) erfüllt, geht dagegen aus ihrer niedrigen Verhältniszahl hervor. Auch für Asparaginsäure scheinen ähnliche Verhältnisse zu gelten, wenn auch in geringerem Maße. Bei der gamma-Aminobuttersäure, die nur im Nervensystem in erheblicher Menge vorkommt und ausschließlich als freie Aminosäure angetroffen wird, handelt es sich um einen pharmakologisch hoch aktiven Wirkstoff (ROBERTS, ROTHSTEIN und BAXTER 1958; PURPURA,

(GIRADO, SMITH und GOMEZ 1958, TAKAHASHI 1958). Auch für Glycin und Serin ist, verglichen mit anderen Aminosäuren, der Anteil der freien Form an der Gesamtmenge noch ziemlich groß. Vielleicht haben auch diese Stoffe gewisse eigene Stoffwechselaufgaben.

Auffallend ist auch die extrem hohe Verhältniszahl der basischen Aminosäuren. Im Gegensatz zum Liquor cerebrospinalis (KNAUFF und SCHABERT 1961) liegen diese im Gehirngewebe fast ausschließlich in gebundener Form vor. Die über diese Aminosäuren ablaufende Harnstoffsynthese, die für die Gehirnzelle erst kürzlich bewiesen werden konnte (DINGMAN, SPORN und DAVIES 1959), muß danach entweder mit so hoher Reaktionsgeschwindigkeit ablaufen, daß geringste Substanzkonzentrationen bereits eine meßbare Syntheseleistung ermöglichen, oder aber man muß annehmen, daß sie im Bedarfsfalle schnell durch spezifische Fermente aus ihren Bindungen gelöst und danach rasch wieder eingebaut werden können. Die Annahme, daß die einzelnen Teilreaktionen des Ammoniakzyklus durch proteingebundene Aminosäuren vermittelt werden, die im Verband der Proteinmoleküle verbleibend nur ihre reaktionsfähigen Gruppen zur Verfügung stellen, dürfte dagegen wenig wahrscheinlich sein. Die gegenüber den basischen Aminosäuren sehr kleine Relationszahl für Glutaminsäure und Glutamin mag jedoch mit als Hinweis dienen, daß normalerweise die Ammoniakbindung an Glutaminsäure für die Gehirnzelle von weitaus größerer Wichtigkeit (WAELSCH 1952; BESSMAN und BESSMAN 1954, 1955; WEBSTER und GABUZDA 1958; VRBA 1955, 1956) zu sein scheint als die Harnstoffbildung und daß diese Funktion sicher hauptsächlich von der freien Glutaminsäure erfüllt wird.

Die Konzentration des Phosphatidserins übertrifft die des freien Serins um das Neunfache. Mit diesem steht jedoch auch das in den Proteinen vorhandene Serin im Gleichgewicht. Die Relationszahl, die das Konzentrationsverhältnis gebundenes Serin durch freies Serin angibt, beträgt bei Mitberücksichtigung des Proteins 90. Auf 90 Moleküle gebundenes Serin kommt im Zentralnervensystem nur ein Molekül freies Serin. Beim Äthanolamin, das in gebundener Form nur in den Phosphatiden vorkommt, ist das Verhältnis wesentlich stärker nach der Seite des freien Amins verschoben. Die Relationszahl beträgt nur 4 und liegt damit um eine bis zwei Zehnerpotenzen unter der fast aller Aminosäuren (siehe oben). Dies ist auffallend, selbst wenn man berücksichtigt, daß bei den Phosphatiden vor allem die Kephaline eine wesentlich höhere Stoffwechselrate haben, als man früher allgemein annahm (DAWSON und RICHTER 1950; ANSELL und DOHMEN 1957; ANSELL und SPANNER 1959, 1960). Ob der gegenüber der gebundenen Form ungewöhnlich hohen Konzentration des freien Äthanolamins ebenso eine eigene noch unbekannte Stoffwechselfunktion im Zentralnervensystem entspricht, bleibt abzuwarten.

in dem vorausgehenden Teil der Arbeit haben wir die Zusammensetzung der serin- und äthanolaminhaltigen Phosphatide und der Gehirnproteine bestimmt. Wir verglichen dann unsere Ergebnisse noch mit anderen Versuchsserien, bei denen die Ratten durch eine entsprechende Insulingabe vorbehandelt waren. Diese Untersuchungen wurden in anderem Zusammenhang veröffentlicht (KNAUFF, MARX und MAYER 1962). Dabei ergab sich die interessante Tatsache, daß bei langdauernder tiefer Hypoglykämie ein gewisser Prozentsatz der von uns bestimmten Phosphatide abgebaut wurde. Auch von anderen Autoren wurde eine Verminderung von freien Fettsäuren und Gehirnlipiden angegeben (PAGE, PASTERNAK und BURT 1931; RANDAL 1940; MC GHEE, PAPA-GEORGE, BLOOM und LEWIS 1951). Für die Gehirnproteine konnten wir im Gegensatz zu ABOOD und GEIGER (1955) keine signifikante Verminderung feststellen. Es ergab sich nun die Frage, welche Stoffe bei anderen komaähnlichen Zuständen die nicht mit Substratmangel oder Krämpfen einhergehen, quantitativ verändert sind.

Wir verglichen deswegen die Ergebnisse einer Versuchsreihe von 12 mit Megaphen in einen komaähnlichen Zustand gebrachten Ratten mit denen von 9 gleichzeitig aufgearbeiteten Normaltieren. Bei weiteren Tieren wurden unter gleichen Versuchsbedingungen einige freie Gehirnaminosäuren untersucht. Beim Insulinkoma haben wir nämlich wesentliche Veränderungen des Aminosäurespektrums gefunden, insbesondere eine Vermehrung von Serin und Äthanolamin, sowie eine Verminderung von gamma-ABS, Glutamin und Glutaminsäure (KNAUFF und BÖCK 1960; 1961).

Wie aus Tab 3 ersichtlich, kam es bei den Megaphenratten zu einer geringen Vermehrung der Phosphatide. Wenn diese Vermehrung wegen der geringen Zahl der untersuchten Tiere statistisch nicht zu sichern ist, so läßt sich doch mit Sicherheit ausschließen, daß ein Abbau stattgefunden hat. Das hypoglykämische Koma und die Narkose infolge Megaphenüberdosierung wirken sich also auf den Stoffwechsel der serin- und äthanolaminhaltigen Phosphatide ganz verschieden aus. Beim Insulinkoma werden die Phosphatide wahrscheinlich mit zur Energiegewinnung herangezogen. Bei der Megaphennarkose bleiben sie intakt.

Ein deutlich verschiedenes Verhalten ergab der Vergleich der Werte der freien Gehirnaminosäuren der mit Megaphen behandelten Tiere mit denen der im Insulinkoma getöteten. Während bei den ersteren die Konzentration der freien gamma-ABS und Glutaminsäure leicht anstieg, wurde bei der Insulinhypoglykämie eine signifikante Verminderung dieser Aminosäuren festgestellt (KNAUFF und BÖCK 1960, 1961).

Besonders interessant ist ein Vergleich der gamma-ABS-Werte beider Versuchsserien. Nach Ansicht verschiedener Autoren soll ein Mangel an gamma-ABS im Gehirn die Krampfbereitschaft des Zentralnervensystems verstärken (ELLIOTT und JASPER 1958; MAKINO und Mit. 1954; TOWER 1956; KILLAM und BAIN 1957; KILLAM 1957; RINDI und FERRARI 1959). Andererseits soll eine Erhöhung der Konzentration der gamma-ABS die polarisierenden (exzitatorischen) dendritischen Synapsen hemmen (BAZMORE, ELLIOTT und FLOREY 1956; PURPURA, GIRADO und GRUNDFEST 1957 a-c; 1958; IWAMA und JASPER 1957; PURPURA, GIRADO, SMITH, CALLAN und GRUNDFEST 1959). Die Ergebnisse unserer beiden Versuchsserien stehen mit dieser Hypothese im Einklang. Bei dem mit starker Krampfbarkeit einhergehendem hypoglykämischen Schock sind die Werte für die freie gamma-ABS des Gehirns signifikant erniedrigt (KNAUFF und BÖCK 1960; 1961). Im Gegensatz dazu ergab sich bei der Nar-kose durch Megaphenüberdosierung eine Erhöhung des Durchschnittswertes, der an der Grenze der Signifikanz liegt. Das würde auch mit anderen Arbeiten, die eine Erhöhung der gamma-ABS nach Behandlung mit zentral sedierenden Pharmaka und auch Alkohol feststellen konnten, gut übereinstimmen (NAUTA und Mit. 1958; WOODBURY und VERNADAKIS 1958; HÄKKINEN und KULONEN 1959).

Die eben genannten Autoren haben teilweise einen bedeutend höheren Anstieg von gamma-ABS feststellen können. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, daß sie nur bestimmte Regionen des ZNS untersuchten, während wir die Konzentration der gamma-ABS im Gesamthirn bestimmten.

Ob die gamma-ABS als physiologische Substanz für die Erregbarkeitsänderung des Zentralnervensystems allein verantwortlich ist oder ob sie nur als Vorstufe für ihre an manchen Substraten bedeutend wirksameren Abkömmlinge Amino-butrylcholin oder beta-Hydroxy-gamma-ABS dient, bleibt abzuwarten (TAKAHASHI, NAGASRIMA und KOSHINO 1958; Mc LENNAN 1957; MITA 1960; HAYASHI 1958; 1959).

Zusammenfassung

Die freien und eiweißgebundenen Aminosäuren sowie das phosphatidgebundene Serin und Colamin des Gesamthirns der Ratten wurden quantitativ bestimmt. Die Konzentration der eiweiß- und phosphatidgebundenen Aminosäuren wurden zu denen der früher bestimmten freien Aminosäuren in Beziehung gesetzt. Die dadurch erhaltenen Verhältniszahlen weichen in ihrer Größe sehr stark voneinander ab. Sie erlauben Schlüsse auf die unterschiedliche Bedeutung und Funktion der einzelnen freien Gehirnaminosäuren. Auf Grund dieser Untersuchungen muß angenommen werden, daß einige Aminosäuren nicht nur als Bausteine für höhermolekulare Substanzen dienen, sondern als freie Aminosäuren bereits eine Eigenfunktion erfüllen.

Da beim phosphatidgebundenen Serin und Colamin sowie bei einigen freien Aminosäuren im hypoglykämischen Schock eine signifikante Veränderung der Konzentration festgestellt worden war, untersuchten wir die gleichen Aminosäuren und das Colamin des Zentralnervensystems in einem durch ein Phenothiazinderivat bedingten, komaähnlichen Zustand. Wir wollten prüfen, welche Veränderungen im Gegensatz dazu bei einem zentral bedingten Koma ohne Substratmangel vor sich gehen. Wir konnten nachweisen, daß es in diesem Fall zu keiner Verminderung dieser Aminosäuren kam. In manchen Fällen ist sogar eine Vermehrung wahrscheinlich. Interessant war das Verhalten der gamma-Aminobuttersäure. Während im hypoglykämischen Koma mit seinen Krämpfen die gamma-Aminobuttersäure signifikant erniedrigt war, fanden wir bei der Megaphennarkose eine leichte Erhöhung derselben. Dieses Ergebnis bedeutet eine neue Stütze für die Hypothese, daß der Erregungszustand des Zentralnervensystems entscheidend von der aktuellen Konzentration der freien gamma-Aminobuttersäure abhängt.

LITERATURVERZEICHNIS!

- 1.) Abderhalden, E. und A. Weil : Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt der verschiedenen Bestandteile des Nervensystems an Aminosäuren. II. Mitt. Die Aminosäuren der grauen und weißen Substanz des Gehirns. Hoppe-Seylers Ztschf. physiol. Chem. 83, 425, 1913.
- 2.) Aboud, L. G. and A. Geiger : Breakdown of proteins and lipids during glucose - free perfusion of the cat's brain. Am. J. Physiol 182, 537, 1955.
- 3.) Ansell, G. B. and H. Dohmen : The Metabolism of individual phospholipids in the rat brain during hypoglycaemia, anaesthesia and convulsions. J. Neurochem. 2, 1, 1957.
- 4.) Ansell, G. B. and G. Spanner : The effect of insulin on the formation of phosphorylcholine and phosphorylethanolamine in the brain. J. Neurochem. 4, 325, 1959.
- 5.) Ansell, G. B. and G. Spanner : Incorporation of orthophosphate labelled with phosphorus -32 into cerebral Phospholipids in vivo. Nature (London), 185, 826, 1960.
- 6.) Astrup, T., A. Stage and E. Olson : A desalting apparatus for amino acids. Acta chem. scand. (Kopenh.). 5, 1343, 1951.
- 7.) Barkulis, S. S., A. Geiger, Y. Kawakita and V. Aquila: A study on the incorporation of C^{14} derived from glucose into the free amino acids of the brain cortex. J. Neurochem. 5, 339, 1960.
- 8.) Bazemore, A., K. A. C. Elliott and E. Florey : Factor I and gamma-Aminobutyric acid. Nature 178, 1052, 1956.
- 9.) Bessman, S. P. und Bessman, A. N. : Federation Proc. 13, 336, 1954; Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85, 66, 1954; J. clin. Invest. 34, 622, 1955.
- 10.) Block, R. J. : Chemical studies on the neuroproteins. I. The amino acid composition of various mammalian brain proteins. J. biol. Chem. 119, 765, 1937.
- 11.) Block, R. J. : Chemical studies on the neuroproteins. II. The effect of age on the amino acid composition of human and mammalian brain proteins. J. biol. Chem. 120, 467, 1937.

- 12.) Block, R. J. : Chemical studies on the neuroproteins. III. An indication for sex differences in the amino acid composition of primate brain proteins. *J. biol. Chem.* 121, 411, 1937.
- 13.) Block, R. J. : A comparative study on two samples of neurokeratin. *Arch. Biochem.* 31, 266, 1951.
- 14.) Bode, F. : Eine Vereinfachung und Verbesserung der Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und Paptiden mittels des Ninhydrin-Kupfer-komplexes. *Biochem. Zschr.* 326, 433, 1955.
- 15.) Clouet, D. H. and D. Richter : The incorporation of methionine into protein fractions of the rat brain. *Biochem. J.* 65, 20 P, 1957.
- 16.) Cohn, P., M. K. Gaitonde and D. Richter : The localisation of protein formation in the rat brain. *J. Physiol.* 126, 7 P, 1954.
- 17.) Cumings, J. H. : Neurochemistry and Neurochemists. *J. clin. Path.* 12, 489, 1959.
- 18.) Dawson, R. M. C. and D. Richter : The phosphorus metabolism of the brain. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B*, 137, 252, 1950.
- 19.) Demling, L., H. Kinzelmeier und N. Henning : Über die quantitative Zusammensetzung der Organproteine (Elektrophoretische Untersuchungen). *Z. exp. Med.* 122, 416, 1954.
- 20.) Dingman, W., M. B. Sporn and R. K. Davies : The chemical fractionation of rat brain proteins. *J. Neurochem.* 4, 154, 1959.
- 21.) Elliott, K. A. C. and H. H. Jasper : gamma-Aminobutyric acid. *Physiol. Rev.* 39, 283, 1958.
- 22.) Elliott, K. A. C., I. H. Page and J. H. Quastel : Neurochemistry. The chemical dynamics of brain and nerv. Charles C. Thomas, Publ., Springfield, Ill. 1955.
- 23.) Fischer, F. G. und H. Dörfel : Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweißhydrolysaten. *Biochem. Z.* 324, 544, 1953.
- 24.) Folch, J. F. and M. Lees : Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins. The ir isolation- from brain. *J. biol. Chem.* 191, 807, 1951.
- 25.) Folch, J. F., M. Lees and C. H. Sloane-Stanley : The role of acitic lipides in the elektrolyte balance of the nervous system. In D. Richter: Metabolism of the nervous System, Pergamon Press, London: P. 174, 1957.

- 26.) Folch, J. F., M. Lees and S. Carr : Exp. Cell Res., Suppl. 5, 88, 1958.
- 27.) Gaby, W. L., N. Naughten and C. Logan : The role of phospholipides in the metabolism of amino acids by the Mold *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem. Biophys. 82, 34, 1959.
- 28.) Gaby, W. L. and R. Silberman : The role of phospholipides in the metabolism of amino acids, II. The incorporation of leucine and thyrosine in liver phospholipides. Arch. Biochem. Biophys. 87, 188, 1960.
- 29.) Gaitonde, M. K. and D. Richter : The metabolism of 35-S-methionine in the brain. In D. Richter: Metabolism of the nervous system, p. 449, Pergamon Press London, New York 1957.
- 30.) Geiger, A. : J. Neurochem. 5, 311, 1960.
- 31.) Geiger, A. N. Horwath and Y. Kawakita : The incorporation of 14 C derived from glucose into the proteins of the brain cortex, at rest and during activity. J. Neurochem. 5, 311, 1960 a.
- 32.) Geiger, A. Y. Kawakita and S. S. Barkulis : Major pathways of glucose utilisation in The brain perfusion experimente in vivo and in situ. J. Neurochem. 5, 323, 1960 b.
- 33.) Grassmann, W., K. Hanning and M. Plöckl : Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Eiweißhydrolysaten durch Kombination von Elektrophorese und Chromatographie. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 299, 285, 1955.
- 34.) Häkkinen, H. M. and E. Kulonen : Increase in the gamma-aminobutyric acid content of rat brain after ingestion of ethanol. Nature (London) 184, 726, 1959.
- 35.) Halliburton, N. D. : The proteids of nervous tissues. J. Physiol. 15, 90, 1894.
- 36.) Hannig, K. : Erfahrungen mit der quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen und automatischer Registrierung der Ergebnisse. Clin. Chem. Acta 4, 51, 1959.
- 37.) Hayashi, T. : Inhibition and excitation due to gamma- amino-butyric acid in the central nervous system. Nature 182, 1076, 1958.
- 38.) Hayashi, T. : The inhibitory action of beta-hydroxy-gamma-amino-butyric acid upon the seizure following stimulation of the motor cortex of the dog. J. Physiol. 145, 570, 1959.

- 39.) Hendler, N. : Passage of radioaktiv amino acids through non protein fractions of hen oviduct during incorporation into protein. J. Biol. Chem. 234, 1466, 1959.
- 40.) Hofman, G. and H. Schinko : Elektrophoretische Trennung von Hirngewebe. Klin. Woschr. 34, 86, 1956.
- 41.) Iwama, K. and H. H. Jasper : The action of aminobutyric acid upon cortical electrical activity in the cat. J. Physiol. 138, 365, 1957.
- 42.) Killam, K. F. : Convulsant hydrazides II: Comparison of electrical changes and enzyme inhibition induced by the administration of thiosemicarbazide. J. Pharm. exp. Therap. 119, 263, 1957.
- 43.) Killam, K. F. and J. A. Bain : Convulsant hydrazides I. In vitro and in vivo inhibition of vitamin B₆ enzymes by convulsant hydrazides. J. Pharmacol. exp. Therap. 119, 255, 1957.
- 44.) Knauff, H. G. : The free amino acids of the cerebrospinal fluid. Nature 182, 937, 1958.
- 45.) Knauff, H. G. und F. Böck : Der Einfluß der Insulinhypoglykämie auf die freien Aminosäuren und das Äthanolamin des Gehirns. Klin. Woschr. 11, 553, 1960.
- 46.) Knauff, H. G. und F. Böck : Über die freien Gehirnaminosäuren und das Äthanolamin der normalen Ratte, sowie über das Verhalten dieser Stoffe nach experimenteller Insulinhypoglykämie. Journal of Neurochemistry 6, 171, 1961.
- 47.) Knauff, H. G., F. Dietzele und H. Zickgraf : Quantitative Bestimmung von 21 freien Plasmaamino-säuren bei gesunden Versuchspersonen. Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Chem. 316, 186, 1959.
- 48.) Knauff, H. G., D. Marx und G. Mayer : Das Verhalten der Proteine und der serin- und colaminhaltigen Phosphatide des Zentralnervensystems während der Insulinhypoglykämie. Hoppe-Seylers Ztschr. f. phys. Chem. 326, 227, 1961.
- 49.) Knauff, H. G., W. Mialkowsky und H. Zickgraf : Über die Bestimmung der freien Aminosäuren des Liquor cerebrospinalis und ihre Bedeutung für die Klinik. Klin. Woschr. 36, 739, 1958.

- 50.) Knauff H. G., W. Mialkowski und H. Zickgraf : Über die freien Aminosäuren des Liquor cerebrospinalis und ihren Nachweis mit kombinierten papierchromatographischen und elektrographischen Methoden. Ztschr. f. klin. Med. 155, 483, 1959.
- 51.) Knauff, H. G. und P. Schabert : Unveröffentlichte Beobachtungen (1960)
- 52.) Knauff, H. G. und P. Schabert : Zur quantitativen Aminosäurebestimmung in Körperflüssigkeiten und Organextrakten nach Elutionschromatographie an Ionenaustauschersäulen mit automatischer Registrierung der Ergebnisse. Klin. Wochschr. 23, 1206, 1960.
- 53.) Knauff, H. G., H. Selmaier und A. Reitlinger : Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Harn und Blutplasma von Gesunden und Leberkranken. Klin. Wochschr. 38, 812, 1960.
- 54.) Knauff, H. G., H. Selmaier und H. Zickgraf : Die freien Aminosäuren in Ascites- und Pleurapunktaten. Hoppe-Seylers Zschr. f. physiol. Chem. 318, 73, 1960.
- 55.) Knauff, H. G. und F. Windsheimer : Das Verhalten von Gesamtaminostickstoff und 21 freien Plasmaamino-säuren bei der experimentellen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff Naunyn-Schmiedebergs Arch. f. exp. Path. und Pharmakol. 239, 442, 1960.
- 56.) Knauff, H. G. und F. Windsheimer : Über das Verhalten der freien Plasmaamino-säuren bei der experimentellen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff. Verh. der Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 66, 487, 1960.
- 57.) Knauff, H. G. und H. Zickgraf : Über das Vorkommen von freien Äthanolamin (Colamin) im Liquor cerebrospinalis des Menschen. Hoppe-Seylers Zschr. f. physiol. Chem. 312, 264, 1958.
- 58.) Lajtha, A. : Amino acid and protein metabolism of the brain. V. Turn-over of leucine in mouse tissues. J. Neurochem. 3, 358, 1959.
- 59.) Lajtha A., S. Berl and H. Waelsch : Amino acid and protein metabolism of the brain. IV. The metabolism of glutamic acid. J. Neurochem. 3, 322, 1959.
- 60.) Lajtha, A. and S. Fürst : Blood- brain- barrier and protein turnover studied with the aid of isotopic lysine. In H. Waelsch: Ultrastructure and cellular chemistry of neurol. tissue. Academic Press inc. publ. N. Y. 1955.

- 61.) Lajtha, A., S. Fürst, A. Gerstein and H. Waelsch : Amino acid and protein metabolism of the brain. I. Turnover of the free and the Protein bound lysine in brain and other organs. *J. Neurochem.* 1, 289, 1957.
- 62.) Levy, A. L. and D. Chung : Two- dimensional chromatography of amino acids on buffer paper. *Analyt. Chem.* 25, 396, 1953.
- 63.) Makino, K. and M. Koike : Competitive inhibition of pyridoxal phosphate action by toxopyrimidine phosphate in the tyrosine decarboxylase system. *Nature (London)* 174, 1056, 1954.
- 64.) Makino, K. and M. Koike : Competitive inhibition of pyridoxal phosphate action by toxopyrimidine phosphate in the tyrosine decarboxylase system. (anti coenzyme). *Enzymologia* 17, 157, 1954.
- 65.) Makino, K., T. Kinoshita, T. Sasaki and T. Shioi : Atoxopyrimidine *Nature* 175, 34, 1954.
- 66.) Makino, K., T. Kinoshita, Y. Aramaki and S. Shintani : Atoxopyrimidine action of vitamins of the B₆ Group. *Nature (London)* 174, 275, 1954.
- 67.) Mc Ghee, E., E. Popageorge, L. Bloom and C. T. Lewis : Effect of hyperinsulinism on brain phosphobride. *J. biol. Chem.* 190, 127, 1951.
- 68.) Mc Ilwain, H. : Biochemistry of the central nervous system. J. & A. Churchill. London 1959.
- 69.) Mc Lennan, H. : A Comparison of some physiological properties of an inhibitory factor from brain (Factor I) and of gamma-aminobutyric acid and related compounds. *J. Physiol. (London)* 139, 79, 1957.
- 70.) Mita, M. : Effects of gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobeta-hydroxybutyric acid on the avoidance conditioned reflexes. *Tohoku J. Exp. Med.* 71, 249, 1960.
- 71.) Moore, S., D. H. Spackman and W. H. Stein : Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analyt. Chem.* 30, 1185, 1958.
- 72.) Nauta, W. Th., H. K. Oosterhuis, C. de Waart and M. J. E. Ernesting : Action of psychotropic drugson gamma-aminobutyric and glutamic acid in rat brain. *Lancet* II, 591, 1958

- 3.) Page, J. H., I. Pasternak and M. L. Burt : Einfluß des Insulins im akuten Versuch auf die Blut- und Organlipide. *Biochem. Z.* 231, 113, 1931.
- 4.) Palladin, A. : Proteins of the nervous system under various conditions. In D. Richter : Metabolism of the nervous system, P. 456, Pergamon Press, London 1957.
- 75.) Palladin, A. and D. Zuwerkalow : Zu Frage der Iminogenese in der grauen und weißen Gehirnschubstanz im Hungerzustande. *Ztschr. physiol. Chem.* 139, 57, 1924.
- 76.) Petrowsky, D. : Zusammensetzung der grauen und der weißen Substanz des Gehirns. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 7, 367, 1873.
- 77.) Purpura, D. P., M. Girado and H. Grundfest : Selective blockade of excitatory synapses in the cat brain by gamma-aminobutyric acid. *Science* 125, 1200, 1924.
- 78.) Purpura, D. P., M. Girado and H. Grundfest : Mode of action of aliphatic amino acids on cortical synaptic activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95, 701, 1957.
- 79.) Purpura, D. P., M. Girado and H. Grundfest : Central synaptic effects of w-guanidino-acids and amino acid derivatives. *Science* 127, 1179, 1958.
- 80.) Purpura, D. P., M. Girado and H. Grundfest : Cortical synaptic pathway analysed with gamma-amino-butyric acid (GABA). *Fed. Proc.* 17, 126, 1958.
- 81.) Purpura, D. P., M. Girado, T. G. Smith, jr. B. S. Gomez and J. A. Gomez : Effects of systematically administered -amino- and guanidino acids on spontaneous and evoked cortical activity in regions of blood brain barrier destruction. *EEG. Clin. Neurophysiol.* 10, 677, 1958.
- 82.) Purpura, D. P., M. Girado, T. G. Smith jr., D. A. Callan and H. Grundfest : Structure activity determinants of pharmacological effects of amino acids and related compounds on central synapses. *J. Neurochem.* 3, 338, 1959.
- 83.) Purpura, D. P., M. Girado, T. G. Smith and J. A. Gomez : Synaptic effects of systemic - aminobutyric acid in cortical regions of increased vaskular permeability. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 348, 1958.
- 84.) Randall, L. C. : Effect of repeated insulin hypoglycemia on the lipid composition of rabbit tissues. *J. biol. Chem.* 133, 129, 1940.

- 85.) Rindi, G. and G. Ferrari : The gamma-amino-butyric acid and glutamic acid constant of brains of rats, treated with toxopyrimidine. *Nature* (London) 183, 608, 1959.
- 86.) Robertson, D. M. : The electrophoretic separation of the soluble proteins of the brain. *J. Neurochem.* 1, 358, 1957.
- 87.) Roberts, E., S. Fränkel and P. J. Harman : Amino acids of nervous tissues. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 383, 1950.
- 88.) Roberts, E., M. Rothstein and C. F. Baxter : Some metabolic studies of -aminobutyrid acid. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 796, 1958.
- 89.) Rossiter, R. J. : Chemical constituents of brain and nerves. In K. A. C. Elliot, I. E. Page and J. H. Quastel: *Neurochemistry*, p. 11. Charles C. Thomas, Publ. Springfield, III, 1955.
- 90.) Spackman, D. H., W. H. Stein and S. Moore : Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30, 1190, 1958.
- 91.) Strecker, H. J. : Glutamic acid and glutamine. In D. Richter : *Metabolism of nervous system*. p. 459, Pergamon Press, New York, 1957.
- 92.) Takahashi, H., A. Nagashima and C. Koshino : Effect of gamma-aminobutyryl-choline upon the electrical activity of the cerebral cortex. *Nature* (London) 182, 1443, 1958.
- 93.) Takahashi, H., M. Tiba, T. Yamazaki and F. Noguchi : On the rhte of action of -amino-butyric acid on blood pressure. *Jap. J. Physiol.* 8, 378, 1958.
- 94.) Tallan, H. H., S. Moore and W. H. Stein : Studies of the free amino acids and related compounds in the tissues of the cat. *J. biol. chem.* 211, 927, 1954.
- 95.) Tower, D. B. : Neurochemical aspects of pyridoxine metabolism and function. *am. J. Clin. Nutr.* 4, 329, 1956.
- 96.) Uzman, L. L. and H. Rosen : Lipophilic peptides and proteins of brain. II. Composition of the neurosclerine fraction. *Arch. Bioch. Biophys.* 76, 490, 1958.
- 97.) Vilkas E. et E. M. Lederer : Purification chromatographique de phosphatides des Mycobacteries. *Seances Acad. sci. (Paris)* 240, 1156, 1955.

- 98.) Vrba, R. : Nature (London) 176, 1258, 1955; J. Neurochem. 1, 12, 1956.
- 99.) Waelsch, H. : Glutamic acid and cerebral function. Adv. Protein Chem. 6, 299, 1951.
- 100.) Waelsch, H. : Certain aspects of intermediary metabolism of glutamine, asparagine and glutathione. Adv. Enzymol. 13, 237, 1951.
- 101.) Waelsch, H. : Nitrogen metabolism in the brain. The biology of mental health and disease. p. 106 New York : Hoeber 1952 a.
- 102.) Webster, L. T. and C. J. Gabuzda : J. clin. Invest. 37, 414, 1958.
- 103.) Weil-Malherbe, H. : Studies an Brain metabolism. I. The metabolism of glutamic acid in Brain. Bioch. J. 30, 665, 1936.
- 104.) Weil-Malherbe, H. : Glutamic acid and its relation to the nervous system. Bioch. J. 50, XXIII, 1952.
- 105.) Weil-Malherbe, H. : Die Funktion der Glutaminsäure im Nervengewebe. Naturwissenschaften 40, 545, 1953.
- 106.) Woodbury, D. M. and A. Vernadakis : Relation of brain excitability to brain gamma-aminobutyric acid concentration. Fed. Proc. 17, 420, 1958.
- 107.) Zoch, E. : Die freien Aminosäuren in der Phosphatidfraktion des Papains. Arzneimittelforschung 8, 236, 1958.

Lebenslauf

Am 12. 4. 1936 wurde ich, Gunther Mayer, als Sohn des Lehrers Richard Mayer und seiner Frau Emma Mayer in Dianaberg, Sudetenland geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1942 bis 1947 in Neuzeudlisch Sudetenland und Nüdlingen / Bayern.

1956 legte ich die Reifeprüfung an der Oberrealschule Bad Kissingen ab.

Die ersten fünf Semester studierte ich in Würzburg, wo ich 1959 das Physikum bestand. Während der klinischen Semester studierte ich in München, wo ich am 1.8.1962 das Staatsexamen beendete.

Seit dem 1.10.1962 arbeite ich als Medizinalassistent im Stiftungs-
krankenhaus Nördlingen

